

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Herken

Untersuchungen zur Pathogenese der experimentellen Myelopathie nach 6-Aminonicotinsäureamid

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Gernot Meyer-Estorf
aus Salzwedel

1975

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Herken

Untersuchungen zur Pathogenese der experimentellen Myelopathie nach 6-Aminonicotinsäureamid

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Gernot Meyer-Estorf

aus Salzwedel

Referent: Prof. Dr. med. Hans Herken

Korreferent: Prof. Dr. H. Coper



**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin**

Promoviert am: 2. 4. 1975

<u>Einleitung</u>	Seite	5
<u>Methodik</u>		12
1. Versuchstiere		12
2. Applikation von 6-AN		12
3. Applikation von p-Chlorphenyl- γ -aminobuttersäure		13
4. Gewinnung des Rückenmarks		17
5. Herstellung der Gewebeextrakte		17
6. Enzymatische Metabolitbestimmung		18
7. Statistische Auswertung		20
<u>Ergebnisse</u>		21
1. 6-Phosphogluconat im Rückenmark nach einmaliger Applikation von 6-AN		21
2. Anreicherung von Gluconat im Rückenmark		22
3. 6-Phosphogluconat und Gluconat nach mehrmaliger Applikation kleinerer Dosen 6-AN		25
4. Intraventriculäre Injektion von 6-AN		28
4.1 6-Phosphogluconat und Gluconat nach intraventriculärer Injektion von 6-AN		29
4.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen nach intraventriculärer Injektion		29
5. 6-Phosphogluconat, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat und Lactat im Rückenmark nach Applikation von 6-AN		32
6. Einfluß von p-Chlorphenyl- γ -aminobuttersäure auf die 6-AN-Intoxikation		34
6.1 Einfluß auf das klinische Bild der spastischen Parese		34
6.2 Einfluß auf die Letalität		36
6.3 6-Phosphogluconat im Rückenmark nach gleichzeitiger Applikation von 6-AN und p-Chlorphenyl- γ -aminobuttersäure		38

Diskussion

Seite 40

1. Akkumulation von 6-Phosphogluconat
und Schädigung der Zellen im Rücken-
mark 40
2. Anreicherung von Gluconat 48
3. 6-Phosphogluconat nach mehrmaliger
Applikation von 6-AN 49
4. Bedeutung der Akkumulation von 6-Phospho-
gluconat für die Funktion der Phospho-
glucose-Isomerase 51
5. Einfluß von p-Chlorphenyl- β -aminobutter
säure 56

Zusammenfassung

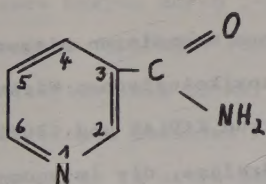
61

Literatur

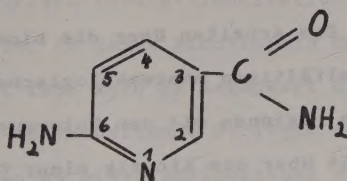
64

E I N L E I T U N G

Die Applikation von 6-Aminonikotinsäureamid (6-AN), einem Antimetaboliten des Nikotinsäureamids, führt bei verschiedenen Versuchstieren zu bemerkenswerten pharmakologischen und toxikologischen Wirkungen. Schon 1955 wiesen JOHNSON und McCOLL auf die biologische Aktivität von 6-AN als Nikotinsäureantagonist hin. Besonders auffällig sind die neurotoxischen Wirkungen, die STERNBERG und PHILIPS 1958 und WOLF et al. 1959 als erste beschrieben. Sie äußern sich bei Albinoratten v. a. in einer irreversiblen spastischen Parese überwiegend der hinteren Extremitäten. Bemerkenswert ist auch die Verstärkung der Wirkung verschiedener Anästhetika (REDETZKI und ALVAREZ-O'BOURKE 1962; COPER und HERKEN 1963; LISON 1969) und die Herabsetzung der Körpertemperatur (COPER et al. 1966; HERKEN 1968; LISON 1969) nach Gabe von 6-AN.



Nikotinsäureamid



6-Aminonikotinsäureamid

Abb. 1: Strukturformeln

Daneben führt dieser Antimetabolit bei der Ratte zur Entleerung der Katecholaminspeicher in der Nebenniere (SCHACHT 1965; SCHACHT et al. 1966), zu einer Herabsetzung der durch Insulin stimulierbaren Glucoseaufnahme in das epididymale Fettgewebe (v. BRUCHHAUSEN und HERKEN 1966), zur Hyperglykämie (v. BRUCHHAUSEN 1965, SCHULTZ et al. 1966), zur Einschränkung des tubulären Natrium- und Kaliumtransportes in der Niere (HERKEN et al. 1964; WIEDERHOLT et al. 1968) sowie zu Veränderungen in der Verteilung der Natrium- und Kaliumionen zwischen extra- und intrazellulärem Raum in der Leber (HERKEN et al. 1966). Embryotoxische und teratogene Wirkungen sind ebenfalls beschrieben worden (CHAMBERLAIN 1966).

Auch beim Menschen wurden nach Applikation von 6-AN neurotoxische Störungen beobachtet, als maligne Tumoren mit dem Antimetaboliten zu behandeln versucht wurde (HERTER et al. 1961).

Die Arbeiten über die biochemischen Grundlagen dieser vielfältigen pharmakologischen und toxikologischen Wirkungen beginnen mit den Untersuchungen von KAPLAN und CIOTTI 1954 über die Kinetik einer Glykohydrolase, die im endoplasmatischen Retikulum der Nervenzelle lokalisiert ist und als Ausdruck der Unspezifität in vitro eine Austauschreaktion katalysiert, welche Nicotinamid in den Coenzymen Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) und Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) durch 6-AN ersetzt.

JOHNSON und McCOLL erbrachten 1956 den Nachweis, daß 6-AN auch in vivo in das NAD eingebaut wird. Sie isolierten 6-Aminonicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (6-ANAD) aus einem Reaktionsgemisch von Schweinehirn-NAD-ase, NAD und 6-AN und wiesen es auch in Leber und Niere von mit 6-AN behandelten Mäusen nach.

DIETRICH et al. 1958 fanden auch 6-Aminonicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat (6-ANADP) in den gleichen Organen von Mäusen. Sie beschrieben wie auch Brunnemann et al. 1964 die in-vitro-Synthese von 6-ANAD und 6-ANADP und stellten fest, daß diese abnorm strukturierten Dinucleotide nicht mehr als Wasserstoffüberträger wirkten. Nach BRUNNEMANN et al. 1963 verläuft ihre Synthese in Gegenwart von NADP schneller als in Gegenwart von NAD.

CO PER und NEUBERT 1964 fanden in vitro eine kompetitive Hemmung des Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6PDH) durch 6-ANADP. Die gleichen Autoren hatten 1963 eine Hemmung dieses Enzyms durch 3-Acetylpyridin-adenin-dinucleotid-phosphat (3-APADP) festgestellt, in denen Nicotinamid durch 3-Acetylpyridin (3-AP) ersetzt ist. Auch in Gegenwart des natürlichen Coenzyms führen 6-AN enthaltende Derivate des NADP unter in vitro-Bedingungen zu einer Ausschaltung der Funktion verschiedener Dehydrogenasen und Reductasen (COPER und NEUBERT 1964). HERKEN und NEUHOFF kamen 1964 bei der quantitativen Bestimmung von 6-AN, 6-ANAD und 6-ANADP in Extrakten von Rattennieren mit Hilfe einer fluorometrischen Methode zu dem Ergebnis, daß sich 6 Stunden

nach intraperitonealer Applikation von 6-AN 38,5 % 6-ANAD und bis zu 70 % 6-ANADP in den Fraktionen der natürlichen Pyridinnucleotide befanden.

Den Beweis, daß solche abnorm strukturierten Nucleotide auch im Zentralen Nervensystem synthetisiert werden können, erbrachten COPER und HERKEN 1962, als sie nach Applikation von 3-AP solche Verbindungen aus dem Gehirn von Ratten isolierten. Dies bestätigten COPER et al. 1966. Bei Untersuchungen am Gehirn von Albinoratten stellten sie fest, daß auch nach Gabe von 6-AN in verschiedenen Dosen im ZNS eine beträchtliche Neubildung von abnorm strukturierten Nucleotiden stattfand.

Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus des im ZNS synthetisierten 6-ANADP wurden in vivo verschiedene NADP-abhängige Enzymsysteme im Gehirn untersucht. Lange Zeit wurde angenommen, daß 6-AN enthaltende Nucleotide den Wasserstofftransport in NAD- bzw. NADP-abhängigen Dehydrogenasen und Reduktasen stören. Dies wurde als Ursache der oben beschriebenen Störungen, insbesondere derjenigen des ZNS diskutiert. HERKEN et al. 1969 fanden, daß in vivo die 6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH) im Pentose-Phosphat-Weg (PPW) durch 6-AN bzw. 6-ANADP am empfindlichsten gehemmt wird. Dagegen war der erste oxydative Schritt im PPW, die Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G-6-PDH) nur geringer beeinflußt (HERKEN 1968).

Nach LANGE et al. 1970 wirkt 6-ANADP in vitro als Hemmstoff 60-fach stärker auf die 6-PGDH als auf die G-6PDH.

Die Anreicherung von 6-Phosphogluconat (6-PG) im Gehirn infolge Hemmung der 6-PGDH hemmt auch in vivo die Phosphoglucose-Isomerase (PGI), was eine Änderung des Gleichgewichts Glucose-6-Phosphat (G-6-P) zu Fructose-6-Phosphat (F-6-P) zu Gunsten von G-6-P zur Folge hat (HERKEN und LANGE 1969; HERKEN et al. 1969; LANGE et al. 1970). Daß 6-PG unter in-vitro-Bedingungen ein starker Hemmstoff der PGI ist, hatten schon PARR 1957 und KAHANA et al. 1960 gefunden.

Bei fortdauernder Ischämie steigt unter 6-AN das Verhältnis G-6-P zu F-6-P an (KELLER et al. 1972). Daneben war bei der enzymatischen Bestimmung der Konzentrationen verschiedener Produkte des Kohlenhydratstoffwechsels die Abnahme des Lactats und des Pyruvats gegenüber den Kontrollen sehr deutlich (KELLER et al. 1972).

Die gleichen Autoren fanden bei der enzymatischen Bestimmung von 6-PG in verschiedenen Regionen des ZNS große Differenzen in der Konzentration dieses Metaboliten, die höchsten Werte wurden im Rückenmark und in der Medulla oblongata gemessen (KELLER et al. 1972).

Bei histopathologischen Untersuchungen des ZNS der mit 6-AN behandelten Tiere werden Schädigungen im verlängerten Mark, in der Brücke und in der Formatio reticularis gefunden. Am stärksten aber wird das Rückenmark betroffen. Für die spastischen Paresen wird eine partielle Zerstörung der Schaltneurone und die dadurch resultierende Deafferenzierung der α -Motoneurone verantwortlich gemacht (WOLF et al. 1962; SCHNEIDER und COPER 1968).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Zellen aus verschiedenen Bereichen des ZNS, die zuerst von Wolff 1970 (zitiert bei HERKEN 1972) und später von Schneider durchgeführt wurden (SCHNEIDER 1971; SCHNEIDER und CERVOS-NAVARRO 1973), haben gezeigt, daß nach Applikation von 6-AN fast ausschließlich primär Oligodendroglia und Astroglia in charakteristischer Weise geschädigt werden.

In dieser Arbeit wird untersucht, ob Beziehungen zwischen der Anreicherung von 6-Phosphogluconat in den Zellen des Rückenmarks und den morphologisch erkennbaren Schädigungen bestehen, die für die spastische Paralyse verantwortlich gemacht werden können. Dabei wird der zeitabhängige Anstieg von 6-Phosphogluconat unter verschiedenen Bedingungen verglichen mit dem zeitlichen Ablauf der von SCHNEIDER 1971 beschriebenen geweblichen Veränderungen und mit dem klinischen Bild der spastischen Parese. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Rückenmarkszellen sollen zeigen, ob nach intraventrikulärer Injektion von 6-AN morphologische Unterschiede zu diesen nach intraperitonealer Applikation beobachteten Gewebsschädigungen bestehen.

Weiterhin soll durch Bestimmung einiger Metabolitkonzentrationen des Kohlenhydratstoffwechsels im Rückenmark nach 6-AN-Applikation geprüft werden, ob die durch 6-PG bedingte Hemmung der PGI auch in den Zellen des Rückenmarks zu ähnlichen Metabolitkonzentrationen führt, wie sie von KELLER et al. 1972 für das Gehirn beschrieben wurden.

Zuletzt wird der Einfluß des Antispastikums p-Chlorphenyl- γ -aminobuttersäure auf das klinische Bild und die hohe Letalität der 6-AN-Intoxikation bei Albinoratten untersucht.

M E T H O D I K

1. Versuchstiere

Alle Versuche wurden an männlichen Albinoratten vom Stamm Wistar mit einem Körpergewicht zwischen 150 und 200 g durchgeführt. Die Tiere erhielten Standarddiät (Altromin R) und Leitungswasser ad libitum. 12 - 14 Stunden vor Applikation von 6-AN wurde den Tieren die Standarddiät entzogen, sie erhielten nur noch Wasser.

2. Applikation von 6-AN

Das in den Versuchen verwandte 6-AN lieferte die Firma Fluka Buchs, es wurde jeweils in 0,9 %-iger Kochsalzlösung injiziert.

Intraperitoneale Applikation:

Den Tieren wurde entweder einmal die relativ große Dosis von 10 bzw. 35 mg 6-AN pro kg Körpergewicht oder mehrmals eine kleinere Dosis intraperitoneal injiziert. Als kleinere Dosis wurde den Tieren 8 Tage lang alle 24 Stunden 1 mg 6-AN pro kg Körpergewicht gegeben. Jeweils einem Teil der Tiere wurde nach 24, 48, 72, usw. Stunden das Rückenmark zur Substratbestimmung entnommen. Es wurde somit die Konzentration von 6-PG und Gluconat nach ein- bis achtmaliger Applikation von 1 mg/kg 6-AN gemessen

Der Versuch wurde mit der Dosis von 2 mg/kg 6-AN wiederholt. Hier wurde die Metabolitkonzentration nach ein- bis sechsmaliger Gabe von je 2 mg/kg 6-AN gemessen.

Intraventrikuläre Injektion:

6 männlichen Ratten (150 - 160 g) wurden je 250 μ g 6-AN, gelöst in 50 μ l 0,9 %-iger Kochsalzlösung, intraventrikulär injiziert.

Zur Kontrolle wurde 5 Tieren je 50 μ l 0,9 %-ige Kochsalzlösung intraventrikulär appliziert.

Die intraventrikuläre Injektion wurde vorgenommen mit einer Hamilton-Microliter-Spritze, wie sie bei der Gaschromatographie verwendet wird. Die Nadel der Spritze war von einer starren Kunststoffhülle umgeben, die nur 5 mm der Nadelspitze freiließ. Diese Kunststoffhülle verhinderte das zu tiefe Eindringen und das Umbiegen der Nadel (Abb. 3). Mit dieser Nadel wurde in Äthernarkose unter sanftem Druck die Sagittalnäht des Schädeldaches in Höhe des Überganges von Frontal- zu Parietalbein senkrecht durchstoßen, so daß die Spitze der Nadel ca. 4 mm intrakraniell im III. Ventrikel lag. (Zur Erläuterung siehe FARRIS und GRIFFITH 1949; KÖNIG und KLIPPEL 1963; Abb. 2 a und 2 b).

3. Applikation von p-Chlorphenyl- γ -aminobuttersäure

p-Chlorphenyl-GABA wurde den Tieren in Dosen von 1, 2, 5 und 10 mg pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Es wurde den Tieren allein, zusammen mit 6-AN

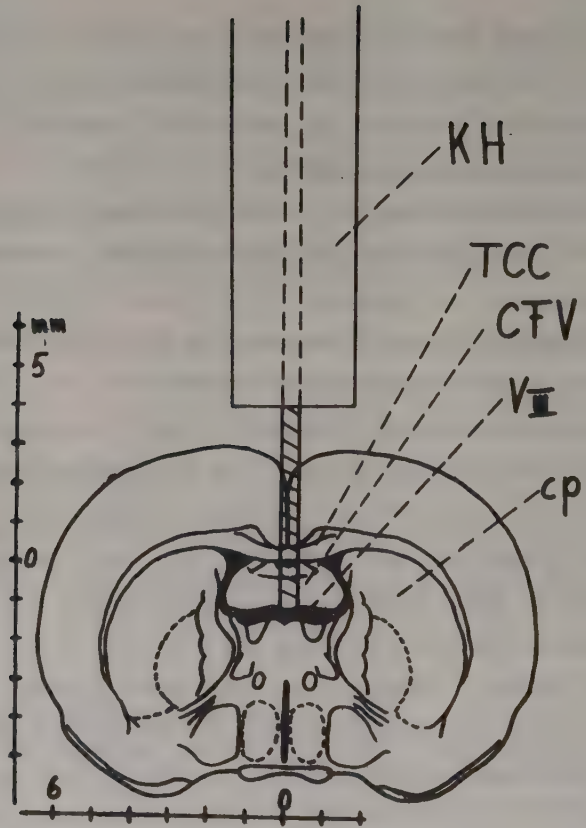


Abb. 2 a: Intraventriculäre Injektion

- | | |
|------------------|------------------------------------|
| KH | Kunststoffhülle um Injektionsnadel |
| CFV | Commissura fornicis ventralis |
| TCC | Truncus corporis callosi |
| V _{III} | Ventriculus tertius |
| cp | Nucleus caudatus putamen |

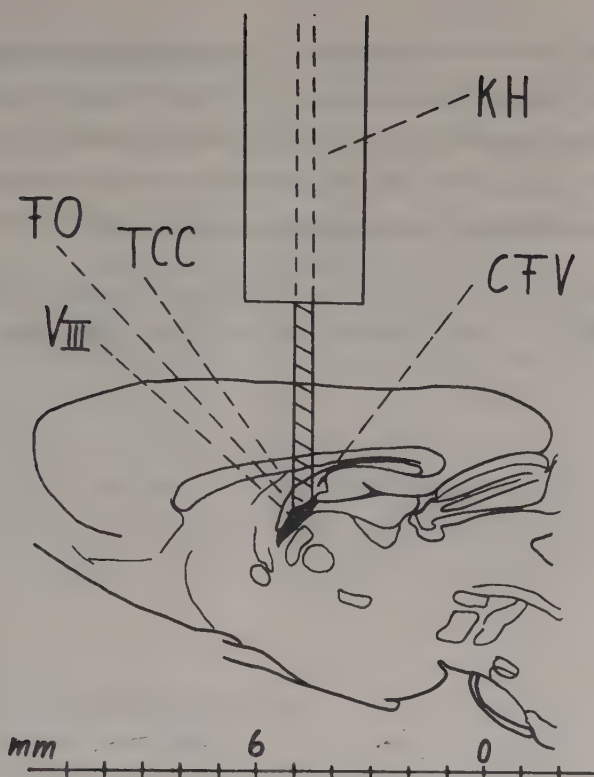


Abb.2 b: Intraventriculäre Injektion

KH Kunststoffhülle um Injektionsnadel

CFV Commissura fornicis ventralis

TCC Truncus corporis callosi

FO Fornix

V_{III} Ventriculus tertius

und nach vorausgegangener 6-AN-Applikation gegeben.

10 Ratten, denen je 10 mg 6-AN/kg intraperitoneal injiziert waren, wurden 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Stunden nach Injektion je 1 mg p-Chlorphenyl- γ -aminobuttersäure pro kg Körpergewicht mit einer Schlundsonde oral verabreicht.

Das in den Versuchen verwendete p-Chlorphenyl-GABA (34'647 Ba) wurde als Reinsubstanz von der Firma CIBA bezogen.

4. Gewinnung des Rückenmarks

Zu den jeweiligen Zeiten nach Applikation von 6-AN wurde den Tieren in Äthernarkose mit einem Skalpell beiderseits der Wirbelsäule die Rückenmuskulatur gespalten und mit chirurgischer Schere die Rippen durchtrennt. Anschließend sofortige Durchtrennung der Wirbelsäule kaudal bei L 3, ventrale Freipräparierung und Durchtrennung der cervicalen Wirbelsäule bei C 3. Eröffnung des Wirbelkanals von kaudal nach kranial mit chirurgischer Schere auf eisgekühlter Steinplatte. Entnahme des Rückenmarks mit anatomischer Pinzette und sofortiges Einbringen in flüssigen Stickstoff (Temperatur -196 Grad Celsius). Die Ischämiezeit (von der Unterbrechung der Blutzirkulation bis zum Gefrierstop) betrug 60 - 90 Sekunden.

5. Herstellung der Gewebeextrakte

Das tiefgefrorene Gewebe wurde in einem Kühlraum bei - 20 bis - 15° C unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu feinstem Pulver zermalen, in ein vorgewogenes Zentrifugenglas mit -15° C kalter 35 %-iger Perchlorsäure (1 ml) überführt und zur Frischgewichtsbestimmung gewogen. Das Frischgewicht eines Rückenmarks betrug 250 bis 450 mg. Das Homogenat wurde bei 5000 Umdrehungen pro Minute in der Kälte von 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein eisgekühltes Becherglas gegossen. Anschließend noch zweimaliges Waschen des Homogenats mit je 1 ml 6 %-iger Perchlorsäure, Zentrifugieren (je 30 Minuten) bei 5000 U/min und Abgießen der Überstände.

Danach wurden die vereinigten Überstände mit Kaliumkarbonat-Lösung auf pH 4 gebracht, vom KClO_4 abzentrifugiert und mit Aqua bidest. auf 10 ml Endvolumen abgefüllt.

6. Enzymatitische Metabolitenbestimmung

6-Phosphogluconat, Gluconat, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat und Lactat wurden im optischen Test nach Warburg an einem Zeiss-Spektrophotometer Typ PMQ II unter Endwertkontrolle mit einem kompensationschreiber bestimmt. Die Kontrolle über den quantitativen Umsatz der Substrate im Bestimmungsansatz erfolgte durch Messung einer definierten Standardmenge, die nach Ablauf der Reaktion in die Meßküvette gegeben wurde.

Die Messung von 6-Phosphogluconat, Gluconat und Lactat wurde in einer 1 cm Küvette, die von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat in einer 5 cm-Küvette durchgeführt. Tabelle I zeigt eine Übersicht über die zur Messung der Substrate verwendeten Puffer, Coenzyme und Enzyme. (Näheres zur Metabolitbestimmung bei BERGMAYER, 1970).

Die benutzten Enzyme, Coenzyme und Eichsubstrate waren ausschließlich Produkte der Firma Boehringer Mannheim GmbH, die anderen Substanzen wurden von Merck Darmstadt bezogen.

Die Berechnung und statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit einem programmierten Elektronenrechner der Firma Hewlett-Packard Typ 9810 A.

Substrate	Puffer	Coenzyme	Enzyme
6-Phosphogluconat	Triäthanolamin 0,3 M, pH 7,5 + MgSO_4 , 3mM	NADP/ATP (200 mg NADP + 1000 mg ATP in 10 ml Aqua dest. gelöse)	Phosphogluconat-Dehydro- genase (10 mg/ml, 6-Phos- pho-D-gluconat: NADP-Oxi- doreduktase, EC 1.1.1.44) Gluconat-Kinase (1 mg/ml, ATP: D-gluconat-6-phospho- transferase EC 2.7.1.12)
Gluconat			
Glucose-6-phosphat	Triäthanolamin, 0,3 M, pH 7,5 + MgSO_4 , mM	NADP (20 mg/ml)	Glucose-6-phosphat-Dehydro- genase (5 mg/ml, D-Glucose- 6-phosphat: NADP-Oxidoreduk- tase, EC 1.1.1.49)
Fructose-6-phosphat			Glucosephosphat-Isomerase (10 mg/ml, D-Glucose-6- phosphat-Ketol-Isomerase, EC 5.3.1.9)
Lactat	Glycin, 0,5 M; + Hydralazin, 0,4 M + EDTA, pH 9,5	NAD (40 mg/ml)	Lactat-Dehydrogenase (25 mg/2,5 ml, L-Lactat- :NAD-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.27)

7. Statistische Auswertung

Die Darstellung der Meßergebnisse erfolgte durch den Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung der Einzelwerte s_x .

Signifikanzberechnung

Da die Voraussetzungen für den **t-Test** nach **STUDENT** gegeben waren, wurde **t** in zweiseitiger Fragestellung nach folgender Formel berechnet (Vergleich zweier Gruppen von Meßergebnissen):

$$\text{Testgröße} \\ t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$$

Freiheitsgrade der Standardabweichung

Freiheitsgrade

$$FG = N_1 + N_2 - 2$$

x = Einzelwerte

$\bar{x}$ = arithmetisches Mittel der Einzelwerte

s = Standardabweichung der Standardwerte

N = Anzahl der Einzelwerte

Der zu den berechneten **t** - Werten gehörende **p** - Wert wurde aus der in den **WISSENSCHAFTLICHEN TABELLEN** (Dokumenta Geigy) befindlichen **t** - Tafel entnommen.

ER G E B N I S S E

1. 6-Phosphogluconat im Rückenmark von Ratten nach einmaliger Applikation von 6-AN

Die einmalige intraperitoneale Applikation von 35 bzw. 10 mg 6-AN pro kg Körpergewicht führte zu einer erheblichen Anreicherung von 6-Phosphogluconat im Rückenmark der Ratten, wie die enzymatische Bestimmung dieses Metaboliten in verschiedenen Zeitabständen ergab. Bei den Kontrolltieren lagen die Werte für 6-Phosphogluconat mit 12 ± 2 nMol pro Gramm Frischgewicht an der unteren Grenze der Empfindlichkeit des benutzten Nachweisverfahrens.

Nach Gabe von 35 mg 6-AN/kg Körpergewicht stieg die Konzentration von 6-Phosphogluconat im Rückenmark kontinuierlich an. Schon 2 Stunden nach Applikation wurden 234 ± 98 nMol/g Frischgewicht gemessen. Bis zur 8. Stunde stieg die Konzentration von 6-Phosphogluconat auf 4332 ± 146 nMol/g Frischgewicht steil an und erreichte 18 Stunden nach Applikation mit 4786 ± 275 nMol ihren Höchstwert (Abb 3, Kurve I).

Nach der kleineren Dosis von 10 mg 6-AN/kg Körpergewicht verläuft der Anstieg von 6-Phosphogluconat langsamer, aber der Unterschied im Maximum des erzielten Effektes ist im Vergleich zur Applikation von 35 mg 6-AN/kg verhältnismäßig gering. Der Höchstwert wird mit 4225 ± 80 nMol/g Frischgewicht nach 24 Stunden gemessen. Noch 48 Stunden nach Gabe von 10 mg 6-AN/kg waren 3848 ± 310 nMol/g

Frischgewicht im Rückenmark enzymatisch nachweisbar
(Abb. 3, Kurve II).

2. Anreicherung von Gluconat im Rückenmark

Neben 6-Phosphogluconat wurde nach 6-AN im Rückenmark der Ratten überraschend auch Gluconat gefunden, das offenbar durch Dephosphorylierung aus 6-Phosphogluconat entstanden war.

Die Konzentration dieses Metaboliten war in den ersten Stunden nach Applikation von 10 mg 6-AN/kg nur gering, hatte aber kontinuierlich ansteigend nach 24 Stunden den erheblichen Wert von 1789 ± 73 nMol/g Frischgewicht erreicht. Auch hier betrug die gemessene Konzentration nach 48 Stunden noch 1724 ± 274 nMol/g Frischgewicht (Abb. 3, Kurve III).

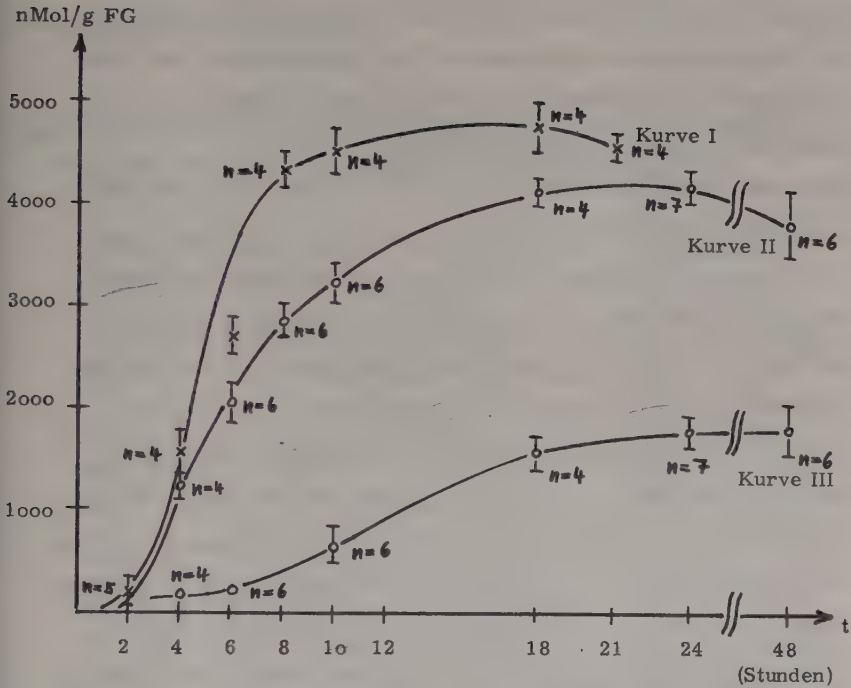


Abb. 3: Zeitabhängiger Anstieg der Konzentration von 6-Phosphogluconat (nMol $\pm$ S.E.M. pro Gramm Frischgewicht) im Rückenmark der Ratte nach par-enteraler Applikation von 35 mg 6-AN/kg (Kurve I) und 10 mg 6-AN/kg Körpergewicht (Kurve II). Zeitabhängiger Anstieg der Konzentration von Gluconat (nMol pro Gramm Frischgewicht $\pm$ S.E.M.) im Rückenmark der Ratte nach intraperitonealer Applikation von 10 mg 6-AN/kg (Kurve III).

Die Albinoratten zeigten nach Applikation von 35 bzw. 10 mg 6-AN pro Kilogramm Körpergewicht bis zum Zeitpunkt der Präparation des Rückenmarks das typische Bild der 6-AN-Intoxikation (STERNBERG und PHILIPS 1958, COPER et al. 1966, SCHNEIDER und COPER 1968, SCHNEIDER 1971).

2 Stunden nach Applikation von 10 mg 6-AN/kg fiel nur ein apathisches Verhalten der Tiere auf, nach 6 Stunden begann eine schlaffe Lähmung der hinteren Extremitäten erkennbar zu werden, der Gang der Tiere wurde breitbeinig und unbeholfen. Nach ca. 24 Stunden ging diese schlaffe Tetraparese allmählich in eine spastische Parese über, was sich vor allem in einer ausgeprägten Streckstellung der hinteren Extremitäten äußerte. Die Tiere lagen auf der Seite und es wurde ein Faszikulieren in der Extremitätenmuskulatur erkennbar. Meist entwickelte sich in der Folgezeit eine deutliche Kyphose der Brustwirbelsäule. Einige Tiere wurden durch einen Trismus am Fressen und Trinken gehindert. Die Schmerz- und Geräuschempfindsamkeit erschien vermindert.

Perlokuläre Blutungen traten oft schon 10 - 12 Stunden nach 6-AN-Applikation (10 mg/kg) auf, häufig auch schon Diarrhoen. Die Tiere starben meist nach 3 - 4 Tagen, sie hatten erheblich an Körpergewicht verloren.

Nach Applikation von 35 mg 6-AN/kg verläuft das Vergiftungsbild ähnlich, aber wesentlich stürmischer. Häufig hatte sich hier schon nach 10 - 12 Stunden aus der schlaffen Lähmung die spastische Parese entwickelt. Auch die anderen Symptome der 6-AN-Intoxikation traten früher als nach

10 mg 6-AN/ kg auf. Die Tiere starben meist 20 - 24 Stunden nach Applikation.

3. 6-Phosphogluconat und Gluconat im Rückenmark von Ratten nach mehrmaliger Applikation kleinerer Dosen 6-AN

Nach Gabe von täglich 1 mg 6-AN/kg an 5 aufeinander folgenden Tagen sowie von täglich 2 mg 6-AN/kg an 2 aufeinander folgenden Tagen zeigten die Ratten erste typische Zeichen der 6-AN-Intoxikation, nämlich struppiges Fell, apathisches Verhalten, unbeholfener breitbeiniger Gang. Nach 6 mal 1 mg 6-AN/kg bzw. 3 mal 2 mg 6-AN/kg traten die ersten typischen Strecklähmungen der hinteren Extremitäten auf. Die Tiere hatten bis zu diesem Zeitpunkt 20 bis 30 g Körpergewichts verloren. Einige Symptome der 6-AN-Intoxikation wie Diarrhoen und periokuläre Blutungen waren nicht erkennbar. Nach 8 mal 1 bzw. 5 mal 2 mg 6-AN/kg litten sämtliche Tiere unter schwersten Strecklähmungen. Feinschlägiger Tremor vor allem der hinteren Extremitätenmuskulatur war erkennbar.

Die enzymatische Bestimmung von 6-Phosphogluconat und Gluconat im Rückenmark dieser Tiere, die jeweils 24 Stunden nach ein-, zwei-, drei- bis achtmaliger Applikation von 1 mg 6-AN/kg und nach ein- bis sechsmaliger Applikation von 2 mg 6-AN/kg vorgenommen wurde, ergab einen kontinuierlichen Anstieg dieser beiden Metaboliten.

24 Stunden nach intraperitonealer Gabe von einmal 1 mg 6-AN/kg waren 6-Phosphogluconat und Gluconat noch nicht in meßbaren Konzentrationen im Rückenmark vorhanden. Auch 48 und 72 Stunden nach dieser einmaligen Applikation war kein Anstieg der Konzentration meßbar. Erst nach zweimaliger Injektion dieser Dosis an 2 aufeinander folgenden Tagen wurden 24 Stunden nach zweiter Injektion $111 + 17$ nMol pro Gramm Frischgewicht 6-Phosphogluconat und 30 nMol Gluconat gemessen. Nach drei-, vier- und fünfmaliger Applikation kam es zu einem steilen Anstieg der Konzentration beider Metaboliten. Nach Gabe von 7 mal 1 mg 6-AN/kg wurden mit $3328 + 46$ nMol 6-Phosphogluconat und $1180 + 67$ nMol Gluconat pro g Frischgewicht die Höchstwerte gemessen (Abb. 4, Kurven I a und I b).

Nach der täglichen Dosis von 2 mg 6-AN/kg ergab die Metabolitbestimmung ein ähnliches Bild. Hier waren aber schon nach Applikation von einmal 2 mg 6-AN/kg 24 Stunden später Konzentrationen von $115 + 47$ nMol 6-Phosphogluconat und $28 + 11$ nMol Gluconat pro g Frischgewicht meßbar. Die Höchstwerte wurden für 6-Phosphogluconat mit $3669 + 222$ nMol pro g Frischgewicht nach fünfmaliger, für Gluconat mit $1729 + 145$ nMol nach sechsmaliger Gabe dieser Dosis gemessen (Abb. 4, Kurven IIa und II b).

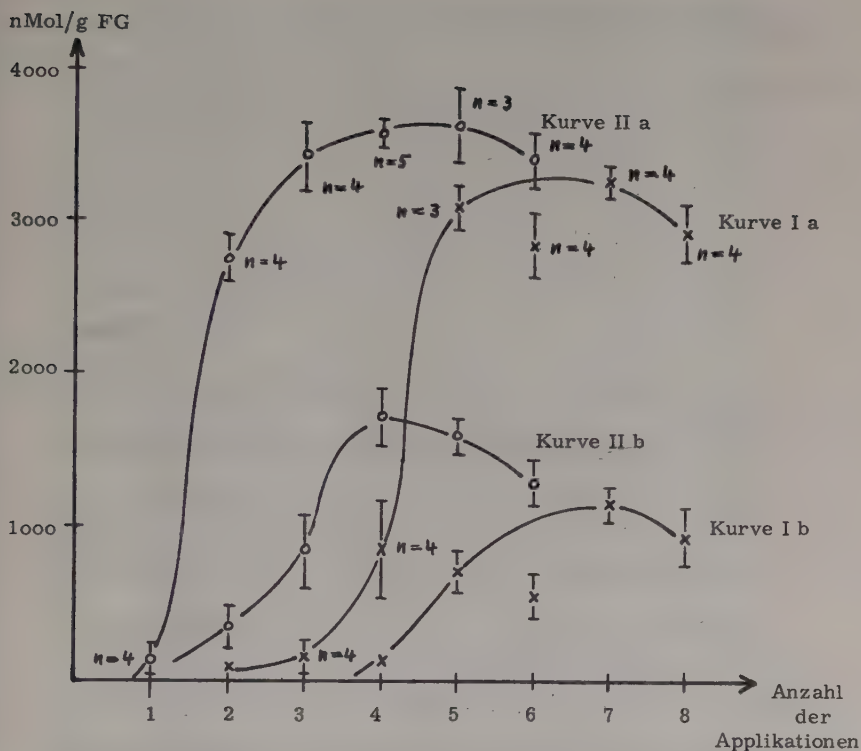


Abb. 4: Anstieg der Konzentration (nMol $\pm$ S.E.M. pro Gramm Frischgewicht) von 6-Phosphogluconat (Kurve I a) und Gluconat (Kurve I b) nach 1 bis 8-maliger Applikation von je 1 mg 6-AN/kg. Anstieg der Konzentration (nMol $\pm$ S.E.M. pro Gramm Frischgewicht) von 6-Phosphogluconat (Kurve II a) und Gluconat (Kurve II b) nach 1- bis 6-maliger Applikation von 2 mg 6-AN/kg.

4. Intraventriculäre Injektion von 6-AN

Nach intraventriculärer Injektion von 250 μ l 6-AN, gelöst in 50 μ l physiologischer Kochsalzlösung, traten die typischen Zeichen der 6-AN-Intoxikation auf. Schon 3 - 4 Stunden nach Injektion wurden bei den 5 behandelten Tieren apathisches Verhalten, struppiges Fell und breitbeiniger, schwerfälliger Gang erkennbar. Nach 10 - 12 Stunden lagen die Tiere auf der Seite, die typischen Streckkrämpfe vor allem der hinteren Extremitäten begleitet von feinschlägigem Tremor, traten auf. Nach 16 und 18 Stunden starben 2 der 5 Tiere mit ausgeprägtesten Zeichen der 6-AN-Vergiftung. Das Bild der Vergiftung glich in seinem stürmischen Verlauf demjenigen, das nach intraperitonealer Injektion sehr hoher Dosen (35 mg/kg und höher) beobachtet wurde.

Die bei 5 Ratten zur Kontrolle vorgenommene intraventriculäre Injektion von 50 μ l physiologischer Kochsalzlösung führte bei 4 Tieren zu keinen merklichen Veränderungen, sie unterschieden sich nach dem Erwachen aus der Narkose in den darauf folgenden Tagen in ihrem Verhalten nicht von unbehandelten gesunden Tieren. Lediglich ein Kontrolltier erwachte nicht aus der Narkose und starb 30 Minuten nach der Injektion.

4.1. Bestimmung von 6-Phosphogluconat und Gluconat im Rückenmark von Ratten nach intraventriculärer Injektion von 6-AN:

Bei den restlichen mit 6-AN behandelten 3 Tieren wurden 20 Stunden nach intraventriculärer Applikation die Metaboliten 6-Phosphogluconat und Gluconat im Rückenmark bestimmt. Mit 4604 ± 325 nMol 6-Phosphogluconat und 1779 ± 209 nMol Gluconat pro g Frischgewicht wurden relativ hohe Mittelwerte gemessen.

4.2. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Rückenmarkszellen nach intraventriculärer Injektion von 6-AN:

20 Stunden nach intraventriculärer Injektion von $250 \mu\text{g}$ 6-AN, gelöst in $50 \mu\text{l}$ physiologischer Kochsalzlösung, bei 3 Tieren, wurde bei einem Versuchstier mit ausgeprägten Zeichen der 6-AN-Vergiftung das Rückenmark extrahiert und zum Zweck der elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Formaldehyd fixiert. Die Rückenmarkszellen zeigten elektronenmikroskopisch die gleichen Schädigungen, die SCHNEIDER 1971 nach parenteraler Applikation beschrieben hat. Man sieht in den Gliazellen wieder das massive Ödem und vor allem die für 6-AN typische vakuoläre Dilatation des granulären endoplasmatischen Retikulum und der perinucleären Cisterne (Abb. 5 a und 5 b).

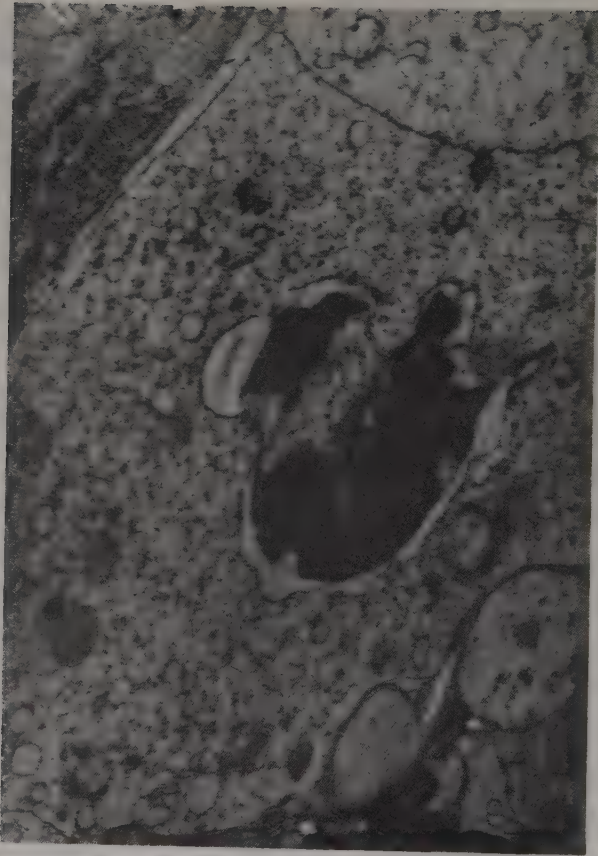


Abb. 5 a

Abb. 5 a und b: Schädigung der Neuroglia 20 Stunden
nach intraventrikulärer Injektion von
250 μ g 6-AN:
Intracystoplasmatisches Ödem mit Dila-
tation des granulären endoplasmatischen
Reticulums und der perinuclären Cisterne.

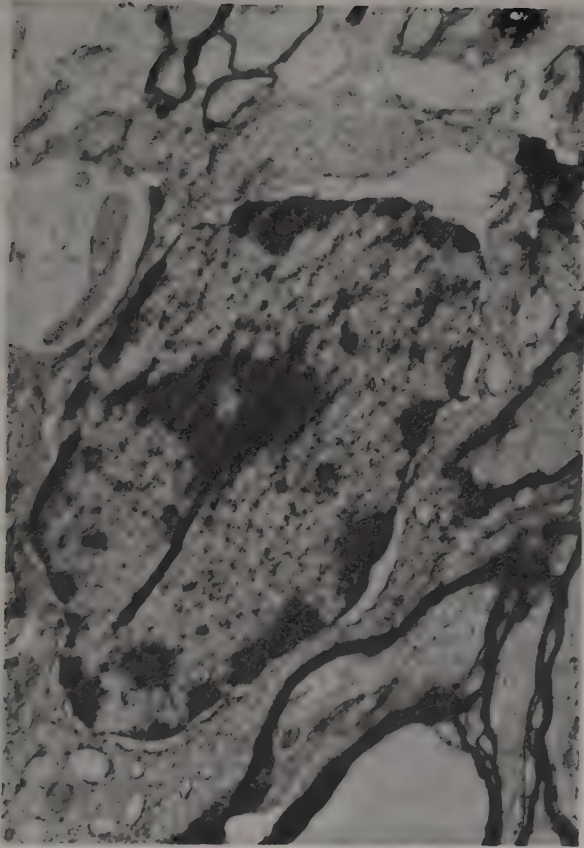


Abb. 5 b

5. 6-Phosphogluconat, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat und Lactat im Rückenmark von Ratten nach Applikation von 6-AN

Die Präparation des Rückenmarks mit anschließendem Gefrierstop erfolgte 9 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 35 mg 6-AN/kg. Die Zeit von der Unterbrechung der Blutzirkulation bis zum Gefrierstop betrug 80 ± 10 Sekunden. Nach dieser Ischämiezeit wurde mit einer Konzentration von 3996 ± 37 nMol pro g Frischgewicht annähernd der gleiche Wert wie oben nach entsprechender Zeit gemessen (s. unter 1. Abb. 3).

Die Konzentration von Glucose-6-phosphat betrug nach 6-AN 216 ± 5 nMol, die von Fructose-6-phosphat $8 \pm 0,5$ nMol pro Gramm Frischgewicht. Demgegenüber lag bei den Kontrolltieren der Wert für Glucose-6-phosphat mit 103 ± 4 nMol/g FG niedriger, der für Fructose-6-phosphat mit 22 ± 2 nMol/g FG höher als nach 6-AN.

6-Phosphogluconat wurde bei den Kontrollen im Rückenmark nur in geringen Konzentrationen (12 ± 2 nMol/g FG) gemessen, sofern die Werte nicht sogar unterhalb der Empfindlichkeit des benutzten Nachweisverfahrens lagen.

Der Quotient Glucose-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat (G-6-P/F-6-P), bei den Kontrollen 4,6 zu 1, stieg nach 6-AN auf 27 zu 1 an.

Lactat wurde im Rückenmark der Kontrolltiere in einer Konzentration von 5100 ± 191 nMol pro g Frischgewicht nachgewiesen. Bei den mit 6-AN behandelten Tieren waren dagegen nach 9 Stunden nur 2956 ± 87 nMol/g FG meßbar. (Tab. 2)

Tabelle 2:

Substrate	Substratkonzentration (nMol/g FG)	
	nach 6-AN (n = 10)	Kontrollen (n = 10)

6 Phosphogluconat	3996 ± 37	---
Glucose-6-Phosphat	216 ± 5	103 ± 4
Fructose-6-phosphat	8 ± 0,5	22 ± 2
G-6-P / F-6-P	27	4,6
Lactat	2956 ± 87	5100 ± 191

6. Einfluß von p-Chlorphenyl- γ -aminobuttersäure (CIBA 34'647-Ba)
auf die 6-AN-Intoxikation bei Ratten

6.1. Einfluß auf das klinische Bild der spastischen Parese

Es wurde der Einfluß des Antispastikums p-Chlorphenyl-GABA auf das klinische Bild der bei Ratten nach 6-AN-Applikation auftretenden spastischen Parese untersucht.

In einem Vorversuch wurde bei gesunden Albinoratten die Wirkung und Verträglichkeit verschieden hoher Dosen p-Chlorphenyl-GABA beobachtet. Je 3 Tieren wurden 10, 5, 2 und 1 mg des Antispastikums pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

20 bis 35 Minuten nach Applikation wurde eine schlaffe Lähmung der Extremitäten, Apathie und deutlich verminderte Atemfrequenz bei den Tieren erkennbar. Nach 1 mg p-Chlorphenyl-GABA pro kg Körpergewicht waren diese Erscheinungen kaum sichtbar, die Ratten erschienen nur sediert und etwas lauffaul. Nach 10 mg/kg waren sie sehr deutlich, die Tiere befanden sich hier in regungsloser Bauchlage und waren stark zyanotisch infolge Atemdepression.

6 bis 8 Stunden nach Applikation zeigten die Ratten wieder völlig normales Verhalten.

Bei gleichzeitiger intraperitonealer Applikation von je 10 mg 6-AN/kg und 5 bzw. 10 mg p-Chlorphenyl-GABA/kg an je 5 Ratten traten 20 bis 35 Minuten nach Injektion schlaffe Lähmung, Apathie und Atemdepression auf, wie sie auch nach

alleiniger Behandlung mit p-Chlorphenyl-GABA beobachtet wurden. Nach Abklingen der p-Chlorphenyl-GABA-Wirkung (nach 6 bis 8 Stunden) begannen die Erscheinungen der 6-AN-Intoxikation sichtbar zu werden. In den folgenden Tagen bildete sich das typische Bild der spastischen Parese v.a. der hinteren Extremitäten aus. Allerdings befanden sich die Tiere bei gleicher Pflege in einem scheinbar besseren Allgemeinzustand als die nur mit 6-AN behandelten Kontrolltiere. 8 der 10 mit p-Chlorphenyl-GABA behandelten Ratten überlebten die 6-AN-Vergiftung, von den 10 Kontrolltieren waren es nur zwei.

Je 3 Ratten wurden 24 Stunden nach Applikation von 10 mg 6-AN/kg mit 5 bzw. 10 mg p-Chlorphenyl-GABA/kg behandelt. Schlaffe Lähmung der Extremitäten, Atemdepression und Apathie traten 20 bis 35 Minuten später auf bzw. verstärkten sich, wenn sie infolge 6-AN schon erkennbar waren. 8 bis 10 Stunden nach Applikation bildete sich wieder das typische Bild der 6-AN-Intoxikation aus. Diese Tiere boten bei weiterer Beobachtung dann das gleiche Bild der Vergiftung wie die Kontrolltiere.

Wurden Ratten mit ausgeprägter spastischer Parese infolge 6-AN-Applikation mit p-Chlorphenyl-GABA behandelt, konnte anschließend keine sichtbare Beeinflussung der Strecklähmung beobachtet werden.

Je 3 Tiere mit ausgeprägter Strecklähmung infolge 6-AN-Applikation 5 Tage zuvor wurden mit 5 bzw. 10 mg des Antispastikums/kg behandelt. Die Strecklähmung bestand danach unverändert weiter, gegenüber den Kontrolltieren war nur eine leichte Sedierung erkennbar.

Die gleichen Beobachtungen wurden gemacht, als je 3 Ratten, die die 6-AN-Intoxikation überlebt hatten, 10 Wochen nach 6-AN-Gabe ebenfalls 5 bzw. 10 mg p-Chlorphenyl-GABA pro kg Körpergewicht erhielten. Auch hier ließ sich das klinische Bild der Strecklähmung durch das Antispastikum nicht sichtbar beeinflussen.

6.2. Einfluß von p-Chlorphenyl-GABA auf die Letalität bei Ratten nach 6-AN-Applikation

Es wurde der Einfluß des Antispastikums p-Chlorphenyl-GABA auf die hohe Letalität infolge 6-AN-Intoxikation bei Ratten untersucht.

Zu diesem Zweck wurden in mehreren Versuchsreihen 117 Albinoratten mit je 10 mg 6-AN/kg und gleichzeitig 5 bzw. 10 mg p-Chlorphenyl-GABA pro kg Körpergewicht behandelt. Das Antispastikum wurde den Tieren intraperitoneal injiziert.

93 dieser 117 Ratten erhielten 12, 24 und 36 Stunden nach 6-AN- und p-Chlorphenyl-GABA-Applikation erneut je 2 mg/kg des Antispastikums intraperitoneal injiziert (Gruppe A).

Die restlichen 24 Ratten wurden nach der einmaligen, zusammen mit 6-AN vorgenommenen Applikation nicht mehr damit behandelt (Gruppe B).

Als Kontrollen wurde 110 Albinoratten nur je 10 mg 6-AN/kg gegeben (Gruppe C).

Von den 93 Tieren der Gruppe A überlebten 61 die 6-AN-Vergiftung, das waren 65,5 %.

Von den 24 Ratten der Gruppe B, die neben 6-AN nur einmal p-Chlorphenyl-GABA injiziert bekamen, überlebten 14 die Vergiftung (58,3 %).

Von den 110 Kontrolltieren, die nur mit 10 mg 6-AN/kg behandelt worden waren, überlebten nur 38 die Vergiftung (34,5 %).

	Anzahl der behandelten Tiere	Anzahl der überlebenden Tiere
Gruppe A (Kontr.)	110	38 (34,5 %)
Gruppe B	93	61 (65,5 %)
Gruppe C	24	14 (58,3 %)

Gruppe A: Tiere, die nur 6-AN erhielten
(Kontrollen)

Gruppe B: Tiere erhielten 6-AN und mehrere
Dosen p-Chlorphenyl-GABA

Gruppe C: Tiere erhielten neben 6-AN nur
einmal p-Chlorphenyl-GABA

Bei allen 3 Gruppen starben die Tiere fast ausschließlich innerhalb der ersten 2 Wochen nach 6-AN-Applikation.

Während dieser Zeit mußten die meisten Tiere mehrmals täglich gefüttert und getränkt werden. Nach 14 Tagen hatte sich ihr Allgemeinzustand in der Regel soweit gebessert, daß die Tiere wieder selbständig fressen und trinken konnten. Die Strecklähmungen vor allem der hinteren Extremitäten bestanden aber meist weiterhin fort und führten zur Atrophie der Muskulatur.

In einem weiteren Versuch wurde je 10 männlichen Albino-Ratten 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 10 mg 6-AN/kg mit einer Schlundsonde je 1 mg p-Chlorphenyl-GABA pro kg Körpergewicht oral gegeben. Auch hier bildete sich das typische Bild der 6-AN-Intoxikation aus, jedoch überlebten 7 von 10 Tieren die Vergiftung. Dagegen starben alle 10 Kontrolltiere, die nur 6-AN bzw. mit der Schlundsonde H_2O erhalten hatten, trotz gleicher Pflege innerhalb der ersten 2 Wochen.

Im akuten Stadium der Vergiftung (ca. 2. bis 10. Tag nach Applikation von 6-AN) schien der Allgemeinzustand der mit p-Chlorphenyl-GABA behandelten Tiere besser zu sein als der der Kontrolltiere.

6.3. 6-Phosphogluconat im Rückenmark nach gleichzeitiger Applikation von 6-AN und p-Chlorphenyl-GABA

Je 10 mg 6-AN und 10 mg p-Chlorphenyl-GABA pro kg Körpergewicht wurden 4 Ratten gleichzeitig intraperitoneal injiziert.

Nach 12 Stunden wurden noch einmal 2 mg p-Chlorphenyl-GABA/kg gegeben.

Nach 24 Stunden wurde den Tieren das Rückenmark zur Metabolitbestimmung entnommen. Mit einem Mittelwert von 4243 ± 194 nMol pro Gramm Frischgewicht wurde annähernd die gleiche Konzentration gemessen, die auch 24 Stunden nach alleiniger Gabe von 6-AN im Rückenmark bestimmt worden war (s. oben).

D I S K U S S I O N

Der Antimetabolit 6-Aminonikotinsäureamid hat die besondere Eigenschaft, eine Myelopathie zu erzeugen, die nicht auf einer Schädigung des Gefäßsystems oder lokalen Durchblutungsstörungen beruht, sondern als Ursache offenbar die Synthese von 6-ANADP hat, das durch Austausch des Nicotinamids im NADP durch 6-Aminonicotinsäureamid besteht und eine Stoffwechselstörung einleitet. Dabei ist die Hemmung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase anscheinend die entscheidende Reaktion. Die Hemmstoffkonstante K_1 für 6-ANADP, gemessen an der Funktion dieses Enzyms im Gehirn, ist mit $1,3 \times 10^{-7} M$ extrem niedrig (LANGE et al. 1970; HERKEN 1970). Keine andere Dehydrogenase wird durch 6-ANADP ähnlich stark gehemmt.

1. Akkumulation von 6-Phosphogluconat und Schädigung der Zellen im Rückenmark

Die enzymatische Bestimmung der Konzentration von 6-Phosphogluconat im Rückenmark der mit 6-AN behandelten Tiere ergibt eine erhebliche Anreicherung dieses Metaboliten, der bei unbehandelten Tieren nur in sehr geringen Mengen vorkommt. Dieses Ergebnis bestätigt die Ergebnisse von LANGE et al. 1970, wonach vor allem im Rückenmark nach 6-AN sehr hohe Konzentrationen zu finden sind. Ähnlich hohe Konzentrationen wurden sonst nur noch in der Medulla oblongata gemessen.

Der Höchstwert war mit ca. 4700 nMol/g FG fast 400 mal so hoch wie der Normalwert, etwa 3 mal höher als der von KELLER et al. 1972 im Hippocampus und 2 mal höher als der im Hypothalamus gemessene Wert. Diese Bevorzugung der Zellen des Rückenmarks ist bemerkenswert, denn es ergibt sich daraus eine erste Beziehung dieser Stoffwechselstörung zur morphologischen Schädigung der Zellen des Rückenmarks und damit der Ausbildung der spastischen Paralyse.

Die Messung des zeitlichen Ablaufs der Akkumulation von 6-Phosphogluconat zeigt, daß nach 10 mg 6-AN/kg der Konzentrationsanstieg innerhalb der ersten 12 Stunden etwas langsamer als nach 35 mg/kg verläuft, aber nach beiden Dosen wird annähernd der gleiche Höchstwert gemessen. Auffallend ist die lang andauernde Akkumulation des Metaboliten, wie man an Hand der nach 24 und 48 Stunden erhaltenen Werte sieht (Abb. 3 S. 23). Man kann annehmen, daß dies zusammenhängt mit der Retention des 6-AN enthaltenden Nucleotids in der Zelle. Nach COPER et al. 1966 verläuft die Hydrolyse des 6-AN enthaltenden Nucleotids sehr viel langsamer als die des natürlichen Coenzym.

Interessant ist nun der Vergleich dieser Ergebnisse mit morphologischen Befunden am ZNS der Ratte nach Vergiftung mit 6-AN. SCHNEIDER und COPER 1968 beschrieben nach 6-AN konstante morphologische Schädigungen im retikulären Grau des Rückenmarks (Lamina VI - VIII nach REXED) und in der

Formatio reticularis des unteren Hirnstammes. Im Bereich der Lamina VI - VIII werden vor allem Interneuronentypen wie Renshaw-Zellen, Gamma-Motoneuronen und Kommissurzellen lokalisiert. Danach ist die spastische Parese der Extremität speziell durch die partielle Zerstörung der Interneuronen und die daraus resultierende Deafferenzierung der Alpha-Motoneurone bedingt. Der dann von SCHNEIDER 1971 an Hand elektronenmikroskopischer Aufnahmen beschriebene Ablauf dieser Schädigung der Rückenmarkszellen zeigt charakteristische Veränderungen der Neuroglia, die nach einem Latenzstadium (ca. 12 Stunden) vor allem im zentralen Vorderhorn der spinalen Grisea auftreten. Auf diese fast selektiv zu nennende Neurogliaschädigung hatte zuerst WOLFF 1970 (zitiert bei HERKEN et al. 1972) nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen aufmerksam gemacht.

Sie läuft in Form einer progredienten Destruktion des granulären endoplasmatischen Reticulums mit zunehmender Vakuolisierung der Tubuli ab und Dilatation perinucleärer Cisternen. Der Zelluntergang beginnt meist am 2. Tag nach Applikation von 6-AN mit der Auflösung der inneren Kernmembran.

Diese Nekrose der Astroglia und Oligodendroglia hat schwere Folgen für die Funktion des zentralnervösen Gewebes. Der Oligodendrogliaschädigung entsprechend kommt es zu charakteristischen degenerativen Veränderungen im Bereich der Markcheiden, und die Astroglianekrose führt zum Zerfall der morphologischen Einheit von Gefäß und Astroglia.

Stärkere Veränderungen am Neuron findet SCHNEIDER erst nach ca. 36 Stunden, die Nervenzelle wird also offensichtlich erst sekundär nach bevorzugter Schädigung von Astro- und Oligodendroglia in Mitleidenschaft gezogen.

Eine Erklärung für diesen Befund kann die von GOLGI 1903 und von RAMON y CAJAL 1909 und 1911 zuerst beschriebene topographische Beziehung von Astroglia zu Kapillare und Neuron sein, deren Richtigkeit durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von DE ROBERTIS und GERSCHENFELD 1961 bestätigt wurde. Danach stellt die Gliazelle durch Fortsätze ein Verbindungsglied dar zwischen Kapillare und Nervenzelle. Ca. 90 % der Kapillaroberfläche sind von den Endfüßchen der Astrogliafortsätze bedeckt (DE ROBERTIS und GERSCHENFELD 1961).

Wahrscheinlich diffundiert der Antimetabolit 6-AN vom Blutgefäß aus vor allem in die Astrogliazellen und führt dort zur Biosynthese von abnorm strukturierten Nucleotiden. Die Oligodendrozyten nehmen das 6-AN wohl direkt durch Diffusion aus dem extrazellulären Raum auf.

Auf eine Kapillarschädigung nach 6-AN, die dann sekundär eine Gliaschädigung zur Folge hat, geben die elektronenmikroskopischen Befunde keinen Hinweis.

Die Astrozyten stehen nun aber mit ihren Fortsätzen nicht nur mit den Kapillaren, sondern auch mit dem Liquorraum in Verbindung (DE ROBERTIS und GERSCHENFELD 1961).



Abb. 6 : Topographische Beziehung eines Astrozyten der grauen Substanz (hell) zu Kapillare (Cap.) und Nervenzelle (neuron) (DE ROBERTIS und GERSCHENFELD, 1961).

CSF = Cerebrospinal-Flüssigkeit, LBB = Liquor-Hirn-Schranke, BBB = Blut-Hirn-Schranke, SB = synaptische Schranke, bas.m. = Basalmembran, oligo = perineuroner Oligodendrozyt

Die Pfeile orientieren über Aufnahme von Antimetaboliten und anderen biologisch wichtigen Substanzen aus dem Blut und deren Strömungen im astrozytären Zytoplasma.

Es stellt sich nun die Frage, ob die Aufnahme von 6-AN aus dem Liquorraum zu ähnlichen Stoffwechselstörungen und morphologischen Schäden im Rückenmark führt.

Bei ihrer Klärung standen erhebliche methodische Schwierigkeiten im Wege, besonders was die Applikation des Antimetaboliten betraf. Die zunächst versuchte intracisternale Injektion von 6-AN gelang bei den Albinoratten nicht. Es konnte mit dieser Methode zwar Liquor entnommen werden, die Injektion von 6-AN, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, führte aber meist zum sofortigen Atemstillstand der Tiere. Erfolgreicher waren die Versuche, den Ratten 6-AN in Narkose intraventriculär zu injizieren (s. Methodik). Die Tiere überlebten diese Applikationsart und die typischen Zeichen der 6-AN-Intoxikation traten auf. Die Verteilung einer intraventriculär applizierten Lösung im Liquor wurde in Vorversuchen bestätigt, denn nach Applikation eines Farbstoffes mit dieser Methode konnte dem Tier anschließend intensiv gefärbter Liquor aus der Cisterne entnommen werden. Auch wurde nach Injektion kleinerer Mengen ^3H -markierten Leucins dieses später deutlich in den Rückenmarkszellen mikroskopisch nachgewiesen.

Die 20 Stunden nach Applikation von 6-AN im Rückenmark der Tiere gefundene Konzentration von 6-Phosphogluconat spricht ebenfalls für die Anwendbarkeit der Methode.

Die Menge von 250 μg 6-AN, gelöst in 50 μl physiologischer Kochsalzlösung, führte zu einer erheblichen Anreicherung

des Metaboliten in den Zellen des Rückenmarks.

Es scheint also kein qualitativer Unterschied gegenüber der Resorption vom Blutgefäß zu bestehen, zumal auch das klinische Bild der Vergiftung typisch war.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Zellen des Rückenmarks nach intraventrikulärer Injektion von 6-AN können diese Aussage bestätigen (Abb. 5 a und 5 b). Die untersuchten Zellen zeigten die gleichen Schädigungen, die auch SCHNEIDER nach intraperitonealer Injektion beschrieben hatte.

6-AN scheint demnach nicht nur vom Blutgefäß, sondern nach intraventriculärer Injektion auch aus dem Liquorraum in erster Linie in die Astrogliazellen zu diffundieren. Es wird in der Literatur beschrieben, daß bei Versuchstieren die intracisternale oder intralumbale Verabreichung einiger anderer Verbindungen (Aluminiumphosphat, 5-Fluoro-Orotsäure, Aktinomycin D) schwere Myelopathien mit vorwiegender Schädigung der Grisea hervorrufen kann (SCHNEIDER 1971).

Infolge dieser Barrierenfunktion der Astroglia zwischen Neuron und Blut bzw. Liquor kann offenbar nur eine geringe Menge 6-AN direkt das Neuron erreichen.

Es ist auch aufgrund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften unwahrscheinlich, daß das in der Gliazelle gebildete 6-ANADP durch die Zellmembran in die Nervenzelle permeiert und damit die Schädigung des Neurons und die spastische Parese erklärt.

Dazu kann eher die oft diskutierte und noch nicht völlig geklärte Beteiligung der Gliazelle an der Ernährung der Nervenzelle beitragen. Die Schädigung von Astro- und Oligodendroglia könnte eine Ernährungsstörung der Nervenzelle zur Folge haben und ihren Untergang bzw. eine irreversible Veränderung bewirken. Dies würde auch die relativ spät auftretende spastische Lähmung erklären.

Weiterhin ist in diesem Zusammenhang der Einfluß von 6-AN enthaltenden Nucleotiden auf den Jonentransport durch biologische Membranen zu erwähnen. Allerdings ist eine derartige 6-AN-Wirkung bisher nur an Leber- und Nierengeweben untersucht worden (HERKEN 1968). Sollte sie auch bei Nerven- und Gliazellen zu beobachten sein, könnte dies erhebliche Folgen für den Ablauf von Erregungsvorgängen haben.

Nach ORKAND et al. 1966 sind für die Depolarisation von Gliazellen Kalium-Ionen verantwortlich, die als Folge von Nervenreizungen freigesetzt werden. Im Zusammenhang mit der Wiederaufnahme von Kalium-Ionen aus dem extrazellulären Raum könnte dann die Depolarisation ein Ergebnis der Kaliumdiffusion aus dem extrazellulären Raum und der aktiven Aufnahme des Ions durch Neuron und Gliazelle sein (KUFFLER und NICHOLLS 1966).

2. Anreicherung von Gluconat

In Verlauf dieser Untersuchungen wurde eine weitere interessante Beobachtung gemacht. Es konnte nämlich nach 6-AN eine beträchtliche Menge freies Gluconat in den Zellen des Rückenmarks nachgewiesen werden. Es wurde, wie unter "Methoden" beschrieben, enzymatisch bestimmt. Bisher ist dieser Metabolit noch nie in den Zellen des ZNS gefunden worden. Offenbar beruht seine Anreicherung auf einer enzymatischen Dephosphorylierung des akkumulierten 6-Phosphogluconats, vielleicht durch die Glucose-6-Phosphatase infolge mangelnder Spezifität des Enzyms (Abb. 7).

Die Bedeutung des Anstiegs von Gluconat für den Stoffwechsel des ZNS ist noch nicht geklärt, doch könnte die intrazelluläre Dephosphorylierung zum Gluconat einen limitierenden Faktor für die Akkumulation von 6-Phosphogluconat darstellen. Daneben ist bekannt, daß Gluconat mit Calcium leicht lösliche Verbindungen eingeht. Die erhebliche Anreicherung dieser Säure könnte daher vielleicht die Verteilung der Ca-Ionen in der Zelle beeinflussen.

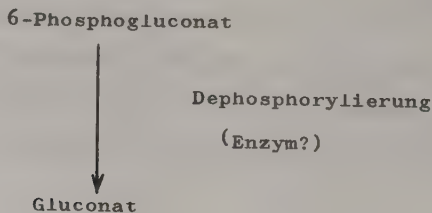


Abb. 7

3. 6-Phosphogluconat nach mehrmaliger Applikation von 6-AN

Nach täglicher Verabreichung von 1 bzw. 2 mg 6-AN/kg im 24 Stunden-Rhythmus kam es, wie unter "Ergebnisse" genauer aufgeführt, zu einer erheblichen Anreicherung von 6-Phosphogluconat (Abb. 4, S.27). Es fällt aber auf, daß erst 5-malige Gabe von 1 mg und 2-malige Gabe von 2 mg/kg, also eine Gesamtmenge von 4 - 5 mg 6-AN/kg, zu diesem erheblichen Anstieg der Konzentration des Metaboliten führt (über 3000 nMol/g FG). Die höchste Konzentration wurde bei der Einzeldosis von 2 mg/kg nach 5-maliger intraperitonealer Applikation gemessen (3669 nMol/g FG). Nach einmaliger Gabe von 10 mg 6-AN/kg lag der Wert nach 24 Stunden nicht wesentlich höher. Es scheint also auf die Anreicherung von 6-Phosphogluconat im Rückenmark kaum einen Einfluß zu haben, ob eine bestimmte Dosis 6-AN (hier 10 mg/kg) auf einmal oder in kleineren Mengen im 24-Stunden-Rhythmus appliziert wird. Beides führt zu einer ähnlich hohen Konzentration von 6-Phosphogluconat im Rückenmark.

Dies bestätigt und ergänzt die Befunde von LISON aus dem Jahre 1969. Der Autor hatte damals noch ohne unsere jetzige Kenntnis über die bevorzugte Hemmung der 6-PGDH und die dadurch bedingten Stoffwechselstörungen die renale Ausscheidung des Antimetaboliten nach intraperitonealer Applikation untersucht. Mit Hilfe spektrofluorometrischer Bestimmung von freiem 6-AN und seinem N-Methylderivat im Urin fand er, daß ca. 12 Stunden nach Gabe des Antimetaboliten 64 % ausgeschieden sind und in den folgenden 12 Stunden nur noch 2 % über die Nieren zur Ausscheidung gelangen. Vorausgesetzt,

daß 6-AN nur als freies 6-AN und N-Methylderivat und nur über die Nieren ausgeschieden wird, verbleibt nach LISON also immer ca. 1/3 des zugeführten 6-AN in freier Form oder in den Pyridinnucleotiden gebunden im Organismus.

LISON fand daher nach täglicher Verabreichung von 1 bzw. 2 mg 6-AN/kg im 24 Stundenrhythmus nach 12 Stunden fast ebensoviel 6-AN im Urin wie nach einmaliger Gabe.

Untersuchungen von Schulze mit ^3H -markiertem 6-AN (MEYER-ESTORF et al. 1972) bestätigten die Kumulation von 6-AN bzw. 6-AN-Analogen in den Zellen des ZNS. Hier waren in den ersten 24 Stunden 68 % des applizierten ^3H -markierten 6-AN mit dem Urin ausgeschieden worden, nach 4 Tagen waren es 77 %. Das Verhältnis der Konzentration des Metaboliten im Blut zu der im ZNS hatte sich deutlich zu Gunsten der letzteren verschoben. Die Konzentration im ZNS war nach 96 Stunden nur gering niedriger als nach 24 Stunden.

Die Kumulation von 6-AN bzw. von NAD(P)-Analogen in den Zellen des Organismus erklärt den Konzentrationsanstieg von 6-Phosphogluconat in den Zellen des ZNS.

Solange sich keine ausreichende Menge des 6-AN enthaltenden Nucleotids in der Zelle angesammelt hat, wie es nach 1 und 2 mg 6-AN/kg offenbar der Fall ist, kommt es zu keinem nennenswerten 6-Phosphogluconat-Anstieg. Erst nach weiterer Gabe wird infolge der Kumulation eine für die Enzymhemmung ausreichende Zellkonzentration erreicht. Jedoch fällt in diesem Zusammenhang auf, daß nach einer bestimmten Gesamt-

dosis (7 mal 1 mg/kg und 4 mal 2 mg/kg) auch bei weiterer Gabe von 6-AN kein Anstieg der 6-Phosphogluconat-Konzentration mehr zu beobachten ist.

Durch die Kumulation von 6-AN bzw. 6-ANADP in den Zellen kann auch die Beobachtung erklärt werden, daß die Ratten bis zu einer Gesamtzufuhr von ca. 6 mg/kg äußerlich kaum Veränderungen zeigen. LISON fand erst nach 5-maliger Applikation von 1 mg 6-AN/kg Gangstörungen der Tiere, als er mit Hilfe von Lauftests an Hand der Spurbreite die motorischen Störungen nach 6-AN schon frühzeitig sichtbar zu machen versuchte. Nach 5 mal 1 mg 6-AN/kg ist auch mit 3095 nMol 6-PG/g FG erstmals eine größere Anreicherung dieses Metaboliten im Rückenmark nachweisbar (Abb. 4, S.27).

Obwohl nach 2 mal 2 mg 6-AN/kg auch schon 2755 nMol 6-PG/g FG im Rückenmark gemessen werden, beobachtete LISON 24 Stunden nach dieser Dosis noch keine Verbreiterung der Spur im Lauftest, diese trat bei den Versuchstieren erst nach dreimaliger Applikation von 2 mg auf (Konzentration von 6-PG hier 3443 nMol/g FG).

Das in den Zellen nachgewiesene Gluconat dürfte sich auch hier durch Dephosphorylierung des akkumulierten 6-Phosphogluconats angereichert haben.

4. Bedeutung der Akkumulation von 6-Phosphogluconat für die Funktion der Phosphogluco-Isomerase

Die Hemmung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase mit Anreicherung von 6-Phosphogluconat, einem phosphorylierten Stoff-

wechselprodukt des oxydativen Pentose-Phosphat-Weges (PPW), ist anscheinend die entscheidende Reaktion, die eine Störung des Hirnstoffwechsels einleitet (HERKEN et al. 1972).

Die Blockade des oxydativen PPW hat nämlich für den Zellstoffwechsel erhebliche Bedeutung, da die beiden ersten NADP-abhängigen Schritte dieses Stoffwechselweges wichtig für die Produktion des reduzierten Coenzyms sind, das u. a. für die Synthese von Fettsäuren benötigt wird.

Die zweite wichtige Funktion des PPW ist die Synthese von Ribose-5-phosphat, das am Aufbau der Nucleinsäuren beteiligt ist. Die Produktion des reduzierten Coenzyms ist nach Applikation von 6-AN kaum beeinträchtigt (HERKEN und NEUHOFF 1964; HERKEN 1968 a, b). Dagegen ließ sich eine erhebliche Verminderung der Produktion von Ribose feststellen (HERKEN et al. 1969), die auch durch den nicht-oxydativen PPW, der im allgemeinen für effektiver gehalten wird, nicht ausgeglichen werden konnte (HERKEN et al. 1972).

Die Hemmung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Anreicherung von 6-Phosphogluconat beeinflusst also offenbar auch den nicht-oxidativen Pentose-Phosphat-Weg.

PARR 1957 und KAHANA et al. 1960 fanden, daß 6-Phosphogluconat in vitro ein starker Hemmstoff der Phosphogluco-Isomerase ist, die eine Schlüsselstellung im Embden-Meyerhof-Weg der Glykolyse einnimmt. Sie katalysiert die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat.

Die enzymatische Bestimmung der Konzentration verschiedener Produkte des Kohlenhydratstoffwechsels im Gehirn (HERKEN et al. 1969; LANGE et al. 1970) sprechen dafür, daß nach 6-AN auch unter den Bedingungen in vivo der Fluß der Substrate in der Glykolyse stark verlangsamt ist, offenbar auch als Folge der durch die Anreicherung von 6-Phosphogluconat gestörten Funktion der PGI.

Die im Rückenmark nachgewiesenen Metabolitkonzentrationen auf der Stufe F-6-P und Lactat deuten ebenfalls auf einen verminderten Substratfluß durch Hemmung der PGI hin. Die Konzentrationen von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat, die Auskunft über den Zustand der PGI geben können, zeigten 9 Stunden nach Applikation von 6-AN deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen. Es wurde eine statistisch gesicherte Zunahme von Glucose-6-phosphat ($p < 0,0002$) und eine signifikante Verminderung der Konzentration von F-6-P ($p < 0,0002$) gegenüber den Kontrollen gefunden. Die normale Relation von G-6-P zu F-6-P beträgt im Rückenmark 4,6 : 1. Nach 6-AN war dieser Quotient deutlich zu Gunsten von G-6-P verschoben und auf 27 : 1 angestiegen.

Daneben fand sich auch eine statistisch gesicherte Abnahme des Lactats im Rückenmark ($p < 0,0002$). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen war die Lactat-Konzentration um ca. 47 % gegenüber den Kontrollen abgesunken. Diese Ergebnisse stimmen in ihrer Aussage mit den von LANGE et al. 1970 unter steady-state-Bedingungen gefundenen Werten überein.

Doch ist es notwendig, an dieser Stelle auf methodische Schwierigkeiten und die sich daraus ergebenden Versuchsbedingungen hinzuweisen. Die Gewinnung des Rückenmarks war immer mit einer Ischämiezeit von ca. 80 Sekunden verbunden. (s. „Methodik“). Es gelang trotz intensiver Bemühungen nicht, diese Zeit zu verkürzen. Lag sie höher als 80 ± 10 Sekunden, wurde das betreffende Rückenmark verworfen und beim Versuch nicht verwendet. Nach LANGE et al. 1970 hat eine Ischämiezeit in dieser Größenordnung keinen Einfluß auf die 6-Phosphogluconat-Konzentration.

Es besteht aber weitgehende Übereinstimmung darüber, daß Hypoxie und Ischämie, auch wenn sie nur kurzfristig einwirken, zu einer Steigerung der Glykolyse mit beträchtlicher Anreicherung von Lactat führen.

Aber auch wenn man diese Tatsache berücksichtigt, so spricht doch die starke Verminderung der Lactat-Werte sowie die Zunahme der Konzentration von G-6-P und Abnahme der von F-6-P in den Zellen des Rückenmarks dafür, daß auch unter diesen Bedingungen der Fluß der Substrate durch die Glykolyse infolge Hemmung der PGI durch 6-Phosphogluconat verlangsamt ist.

Dieses Ergebnis wird durch die Befunde von KAUFFMAN und JOHNSON 1974 bestätigt.

Die Autoren fanden im Gehirn von Mäusen auch unter den Bedingungen der Ischämie nach 6-AN eine deutliche Verminderung der Lactatproduktion. Die Lactatbildung war nach 30 Sekunden Ischämie annähernd 25 % geringer als die im Gehirn der unbe-

handelten Tiere. Die Konzentration von 6-Phosphogluconat war unverändert hoch.

Daß unter den Bedingungen der Ischämie nach 6-AN die Phosphogluco-Isomerase eindeutig gehemmt wird, geht auch aus den Befunden von KELLER et al. 1972 hervor. Mit zunehmender Dauer der Ischämie fanden sie ein ansteigendes Verhältnis der Konzentrationen von G-6-P zu F-6-P, so daß nach 60 Sekunden ein Quotient von über 42 erreicht wurde. Allerdings beobachteten sie nach 6-AN überraschend eine schnellere Lactatbildung, die mit Fortdauer der Ischämie gegenüber den Kontrollen weit höhere Werte erreichte. Dieser widersprüchliche Befund über den Einfluß der Ischämie auf den glykolytischen Fluß nach 6-AN bedarf noch genauerer Klärung.

5. Einfluß von p-Chlorphenyl- γ -aminobuttersäure

Zur Klärung der Frage, ob das Modell der spastischen Paralyse nach 6-AN zur Prüfung antispastisch wirkender Substanzen geeignet ist, wurden Versuche mit p-Chlorphenyl- γ -aminobuttersäure durchgeführt. Die Angriffspunkte dieser wirksamen Substanz sind nach den bisherigen Ergebnissen in erster Linie im Spinalmark zu suchen, ein genauer Wirkungsmechanismus ist aber noch nicht bekannt (BEIN 1971). Die klinische Erprobung dieses Antispastikums in den letzten Jahren zeigt, daß es vor allem bei spastischen Zuständen

infolge Rückenmarksläsionen, wie z.B. bei der spinalen Form der multiplen Sklerose wirksam ist (JONES 1971; KNUTSSON et al. 1971; PINTO et al. 1971).

Es handelt sich bei p-Chlorphenyl- γ -aminobuttersäure um den Vertreter einer neuen Wirkstoffklasse. Aufgrund seiner chemischen Struktur kann dieses Antispastikum nämlich als Derivat der Gamma-Aminobuttersäure (GABA) aufgefaßt werden, die im Gehirn vorkommt und der seit Jahren eine Bedeutung als Überträgersubstanz zentraler, besonders kortikaler, inhibitorischer Neuren zugeschrieben wird (KRNJEVIC 1970).

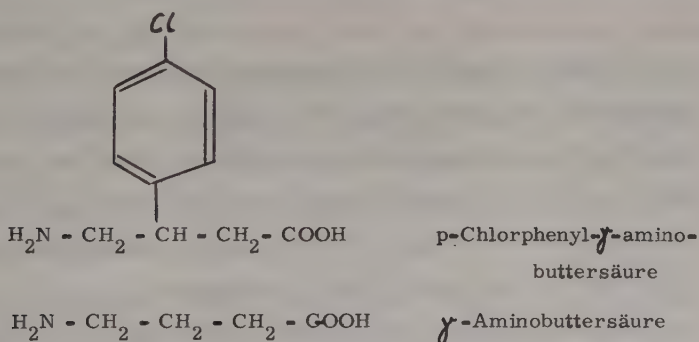


Abb. 9 : Strukturformeln

Die bei gesunden Albinoratten vorgenommene intraperitoneale Applikation von p-Chlorphenyl-GABA führte bei höherer Dosierung zu muskulärer Hypotonie bis hin zur schlaffen Lähmung, zu Verlangsamung der Atmung und zu Sedierung. p-Chlorphenyl-GABA hatte also neben der spinalen auch eine supraspinale bzw. kortikale Wirkung. Im Gegensatz zu GABA tritt bei p-Chlorphenyl-GABA die kortikale bzw. supraspinale Wirkungskomponente gegenüber der spinalen zurück. Auch in anderen Wirkungen bestehen erhebliche Unterschiede trotz chemisch-struktureller Ähnlichkeit (BEIN 1971).

Bei der Spastik nach 6-AN führte die Anwendung von p-Chlorphenyl-GABA zu keiner klinisch erkennbaren Besserung. Wenn sich die Strecklähmung voll ausgebildet hatte, was in der Regel nach 2 - 3 Tagen der Fall war, ließ sie sich selbst durch die sehr hohe Dosis von 10 mg/kg, intraperitoneal appliziert, nicht mehr klinisch erkennbar beeinflussen. Dabei fiel auf, daß die Tiere gegen das Mittel relativ unempfindlich geworden waren. Meist schienen sie nur noch leicht sediert zu sein.

Zur Klärung dieser Beobachtung könnte der morphologische Befund in der spinalen Grisea nach 6-AN beitragen. Es ist zwar trotz detaillierter neurophysiologischer Kenntnis über die Organisation des Rückenmarks bisher nicht möglich, Gamma-Motoneuronen oder die Interneuronen vom Renshaw-Typ

histologisch zu differenzieren, es ist aber anzunehmen, daß v. a. diese Zellen mit den übrigen Zwischenneuronen infolge der Glianekrose nach 6-AN geschädigt sind, woraus eine teilweise Deafferenzierung der Alpha-Motoneuronen resultiert (SCHNEIDER und COPER 1968).

Es ist nun denkbar, daß infolge der 6-AN-Schädigung das Antispastikum im Rückenmark und vielleicht auch in höheren Zentren keinen oder nur einen noch reduziert vorhandenen Wirkort findet. Bisher ist über die Wirkungsweise von p-Chlorphenyl-GABA bekannt, daß ein Angriffspunkt an der sogenannten Alpha-Gamma-Schleife zu suchen ist, wo es die Entladung des efferenten Gamma-Schenkels hemmen und damit die Aktivität des Muskel-Spindel-Apparates herabsetzen soll (BEIN 1971). Weitere Angriffspunkte werden nach BEIN bei inhibitorischen Interneuronen diskutiert, wodurch die Alpha-Motorik segmental beeinflusst werden soll.

Eine weitere interessante Beobachtung fiel bei der Behandlung der spastischen Tiere mit p-Chlorphenyl-GABA auf: In der Regel wurde bei ihnen ein besserer Allgemeinzustand nach 6-AN beobachtet als bei den Kontrolltieren, obwohl kein Unterschied im Ausmaß der spastischen Paralyse zu erkennen war. Dies wurde aber nur dann beobachtet, wenn p-Chlorphenyl-GABA zu gleicher Zeit oder kurz nach Applikation von 6-AN verabreicht wurde. Es hatte den Anschein, als habe das Antispastikum eine gewisse Schutzfunktion gegenüber der 6-AN-Intoxikation. Es muß noch einmal darauf hingewiesen werden, daß die Pflege der Tiere (füttern, tränken usw), die im akuten

Stadium der 6-AN-Vergiftung notwendig war, die gleiche war wie bei den Kontrollen.

Die Konzentration von 6-Phosphogluconat im Rückenmark dieser Tiere war unverändert hoch. Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen scheinen zumindest im Rückenmark keinen abweichenden Befund zu geben (SCHNEIDER 1973, persönliche Mitteil.).

Beim Studium der Wirkung von p-Chlorphenyl-GABA wurde eine auffällige Beobachtung gemacht, die dafür spricht, daß die Verbindung neben der Wirkung auf das Rückenmark noch andere Funktionen des ZNS beeinflußt. Nach histologischen Untersuchungen werden für die letale Wirkung von 6-AN Veränderungen in der *Formatio reticularis* und in der *Medulla oblongata* verantwortlich gemacht (SCHNEIDER 1971).

Es zeigte sich, daß die mit p-Chlorphenyl-GABA behandelten Tiere in erheblich höherer Zahl die 6-AN-Intoxikation überlebten. Es war fast die doppelte Anzahl im Vergleich zu den Kontrolltieren. Bei den mit p-Chlorphenyl-GABA behandelten Tieren, die die Vergiftung überlebten, schien eine Besserung der histologischen Befunde erkennbar (SCHNEIDER 1973, persönliche Mitteil.) Dies bedarf jedoch noch weiterer Klärung.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Der Antimetabolit 6-Aminonikotinsäureamid (6-AN) erzeugt bei Ratten eine irreversible spastische Parese. Durch die mangelnde Spezifität einer Glykohydrolase des endoplasmatischen Retikulums werden aus NAD und NADP durch Austauschreaktion von 6-AN gegen Nikotinsäureamid 6-Aminonikotinsäureamid-adenin-dinucleotid (6-ANAD) und 6-Aminonikotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat (6-ANADP) gebildet. 6-ANADP ist ein wirksamer Hemmstoff der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und verursacht eine Blockade des Pentose-Phosphat-Weges mit Akkumulation von 6-Phosphogluconat. Die höchsten Konzentrationen von 6-Phosphogluconat wurden bisher in den Regionen des ZNS festgestellt.

Die Messung des zeitlichen Ablaufs der Akkumulation von 6-Phosphogluconat im Rückenmark nach parenteraler Applikation von 10 und 35 mg 6-AN/kg ergibt einen Höchstwert nach 18 - 24 Stunden. Die Konzentration war hier fast auf das 400-fache der Norm angestiegen. Daneben wurde in den Zellen des Rückenmarks der mit 6-AN behandelten Ratten eine erhebliche Menge von freiem Gluconat nachgewiesen, die offenbar auf einer enzymatischen Dephosphorylierung des akkumulierten 6-Phosphogluconat beruht.

Die intraventrikuläre Applikation von 6-AN führte ebenfalls zu einer erheblichen Anreicherung von 6-Phosphogluconat im Rückenmark und zum typischen klinischen Bild der 6-AN-Intoxikation. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Rückenmarkszellen der intraventrikulär behandelten Tiere zeigen auch die schon von SCHNEIDER 1971 nach parenteraler Applikation beschriebene primäre Schädigung der Astro- und Oligodendroglia. Die topographische Beziehung der Neuroglia zu Kapillare, Liquorraum und Neuron begünstigt die Aufnahme von 6-AN und erklärt die charakteristische Zellläsion, die in der spinalen

Grisea dann die Schädigung des Neurons und damit die spastische Parese zur Folge hat.

Nach täglicher intraperitonealer Applikation von 1 bzw. 2 mg 6-AN/kg kam es wiederum zu einer erheblichen Anreicherung von 6-Phosphogluconat und Gluconat. Es scheint auf die Akkumulation von 6-Phosphogluconat in den Zellen des Rückenmarks kaum einen Einfluß zu haben, ob eine bestimmte Dosis 6-AN auf einmal oder in kleineren Mengen im 24-Stunden-Rhythmus appliziert wird. Als Ursache darf die Kumulation von 6-AN bzw. NAD(P)-Analogen in den Zellen des Organismus angenommen werden.

Die Akkumulation von 6-Phosphogluconat durch Hemmung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase hat auch in den Zellen des Rückenmarks eine Funktionsstörung der Phosphoglucose-Isomerase zur Folge, die eine Schlüsselstellung im Embden-Meyerhof-Weg einnimmt.

Es finden sich bei den mit 6-AN behandelten Tieren charakteristische Abweichungen im Kohlenhydratstoffwechsel, die zu dem Schluß verleiten können, daß der glykolytische Fluß aufgrund der Hemmung der Phosphoglucose-Isomerase auch unter den Bedingungen der Ischämie deutlich verlangsamt ist.

Das Modell der spastischen Paralyse nach 6-AN bot sich zur Prüfung der antispastisch wirkenden Substanz p-Chlorphenyl- γ -aminobuttersäure an, die vor allem bei spastischen Zuständen infolge Rückenmarksläsionen wirksam ist.

Bei der Spastik nach 6-AN führte die Anwendung von p-Chlorphenyl- γ -aminobuttersäure zu keiner klinisch erkennbaren Besserung, was dadurch erklärt werden könnte, daß das Antispastikum infolge der 6-AN-Schädigung im Rückenmark keinen oder nur noch einen reduziert vorhandenen Wirkort findet.

Es wurde aber die Beobachtung gemacht, daß die mit p-Chlorphenyl- γ -aminobuttersäure behandelten Tiere in erheblich höherer Zahl die 6-AN-Intoxikation überlebten.

Die Konzentration von 6-Phosphogluconat im Rückenmark dieser Tiere war unverändert hoch.

L I T E R A T U R

- BEIN, H.J.: Aus "Aspekte der Muskelspastik", herausgegeben von
W. Birkmeyer, Verlag Hans Huber, Bern-Stuttgart-Wien (1972)
- BERGMEYER, H.U.: "Methoden der enzymatischen Analyse", Band II,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1970)
- v.BRUCHHAUSEN, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.
Pharmakol. 250 : 241 (1965)
- v.BRUCHHAUSEN, F., H.HERKEN: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.
Path. Pharmacol. 254 : 388 (1966)
- BRUNNEMANN, A., H.COPER, H.HERKEN: Naunyn-Schmiedebergs
Arch. exp. Path. Pharmacol. 245 : 541 (1963)
- BRUNNEMANN, A., H.COPER, D.NEUBERT: Naunyn-Schmiedebergs
Arch. exp. Path. Pharmacol. 246 : 437 (1964)
- CHAMBERLAIN, J.G.: Anat. Rec. 156 : 31 (1966)
- COPER, H., H.HERKEN: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.
Pharmakol. 243 : 291 (1962)
- COPER, H., H.HERKEN: Dtsch. med. Wschr. 88 : 2025 (1963)
- COPER, H., D.NEUBERT: Biochem. biophys. Acta 89 : 23 (1964)
- COPER, H., H.HADASS, H.LISON: Naunyn-Schmiedebergs Arch.
Pharmakol. exp. Path. 255 : 97 (1966)
- DE ROBERTIS, E., H.M.GERSCHENFELD: Int. Rev. Neurobiol. 3 : 1
(1961)
- DIETRICH, L.S., I.M.FRIEDLAND, L.A.KAPLAN: J. biol. Chem.
233 : 964 (1958)
- FARRIS, M., L.GRIFFITH: "The Rat In Laboratory Investigation",
Philadelphia-London-Montreal (1949)
- GOLGI, C.: Opera omnia , Band I, S. 40, Milano: U.Hoepli (1903)
- HERKEN, H., V.NEUHOFF: Naunyn Schmiedebergs Arch. exp. Path.
Pharmakol. 247 : 187 (1964)

- HERKEN, H., G. SENFT, B. ZEMISCH: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 249 : 54 (1964)
- HERKEN, H., G. SENFT, B. ZEMISCH: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 253 : 364 (1966)
- HERKEN, H.: Proc. 3-rd Pharmacological Meeting, vol. 4, p. 3 Pergamon Press (1968a)
- HERKEN, H.: Arzneimittel-Forsch. 18 : 1235 (1968b)
- HERKEN, H., K. LANGE: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 263 : 496 (1969)
- HERKEN, H., K. LANGE, H. KOLBE: Biochem. biophys. Res. Commun. 36 : 93 (1969)
- HERKEN, H.: Klin. Wschr. 51 : 644 (1973)
- HERTER, F. P., S. G. WEISSMAN, H. G. THOMPSON, G. HYMAN, D. S. MARTIN: Cancer Res. 21 : 31 (1961)
- HORECKER, B. L.: Carbohydrate Metabolism and its Disorders, vol. 1, p. 142, London-New York, Academic Press (1968)
- JOHNSON, W. J., J. D. MCCOLL: Science 122 : 834 (1955)
- JOHNSON, W. J., J. D. MCCOLL: Fed. Proc. 15 : 284 (1956)
- JONES, R. F.: Aus "Aspekte der Muskelspastik", herausgegeben von W. Birkmeyer, Verlag Hans Huber, Bern-Stuttgart-Wien (1972)
- KAHANA, W. J., O. H. LOWRY, D. W. SCHULTZ, J. V. PASSONNEAU, E. J. CRAWFORD: J. biol. Chem. 235 : 2178 (1960)
- KAPLAN, N. O., M. M. CIOTTI: J. amer. chem. Soc. 76 : 1713 (1954)
- KAUFFMAN, F. C., E. C. JOHNSON: in press (1974)
- KELLER, K., H. KOLBE, K. LANGE, H. HERKEN: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 353 : 1389 (1972)
- KNUTSSON, E., U. LINDBLOM, A. MARTENSSON: Aus "Aspekte der Muskelspastik", herausgegeben von W. Birkmeyer, Verlag Hans Huber, Bern-Stuttgart-Wien (1972)
- KÖNIG, J. F. R., R. A. KLIPPEL: Aus "The Rat Brain", The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1963

- KRNJEVIC, K.: Nature 228 : 119 (1970)
- KUFFLER, S.W., J.G. NICHOLLS: Ergebnisse der Physiologie, Band 57,
Hrsg. K. Kramer et al., S. 1 - 90. Berlin-Heidelberg-New York,
Springer 1966
- LANGE, K., H. KOLBE, K. KELLER, H. HERKEN: Hoppe-Seylers Z.
physiol. Chem. 351 : 1241 (1970)
- LISON, H.: Inaugural-Diss. Med. Fak. Freie Univ. Berlin (1969)
- MEYER-ESTORF, G., P.E. SCHULZE, H. HERKEN: Naunyn-Schmiedeberg's
Arch. Pharmacol. 276 : 235 (1973)
- ORKAND, R.K., J.G. NICHOLLS, S.W. KUFFLER: J. Neurophysiol.
29 : 788 (1966)
- PINTO, O., M. POLIKAR, P. LOUSTALOT: Aus "Aspekte der Muskel-
spastik", herausgegeben von W. Birkmeyer, Verlag Hans Huber,
Bern-Stuttgart-Wien (1972)
- PARR, C.W.: Biochem. J. 65 : 34 (1957)
- RAMON y CAJAL, S.: Paris : A. Maloine (1909/1911)
- REDETZKI, H.M., F. ALVAREZ-O 'BOURKE: J. Pharmacol. exp.
Therapeut. 137 : 173 (1962)
- SCHACHT, U.: Inaugural-Diss. Med. Fak. Freie Univ. Berlin (1965)
- SCHACHT, U., G. SCHULTZ, G. SENFT: Naunyn-Schmiedeberg's Arch.
exp. Path. Pharmacol. 253 : 355 (1966)
- SCHNEIDER, H., H. COPER: Arch. Psychiatr. Nervenkr. 211 : 138
(1968)
- SCHNEIDER, H.: Habilitationsschr. Fachber. Klin.-Theor. Med.
Freie Univ. Berlin (1971)
- SCHNEIDER, H., J. CERVOS-NAVARRO: Acta neuropath. (Ber.)
27 : 11 (1974)
- SCHULTZ, G., G. SENFT, W. LOSERT, U. SCHACHT: Naunyn-Schmiede-
berg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 253 : 345 (1966)
- STERNBERG, S.S., F.S. PHILIPS: Science 127 : 644 (1958)

WIEDERHOLT, M., K. HIERHOLZER, G. SENFT, H. HERKEN :

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 261 : 143
(1968)

WOLF, A., D. COWEN, L. M. GELLER : Trans. Amer. neurol. Ass.
84 : 140 (1959)

WOLF, A., D. COWEN, L. M. GELLER : Proc. 4 th Intern. Congr.
Neuropathol., Vol. III, Ed. Jakob, H., Stuttgart, Thieme,
pp. 447 (1962)

Herrn Professor Dr. med. H. Herken danke ich herzlich für die Überlassung des Themas der Arbeit und die zahlreichen Ratschläge und Anregungen, die für die Durchführung und Abfassung der Arbeit eine wertvolle Hilfe bedeuteten. Meinen besonderen Dank möchte ich ihm dafür aussprechen, daß er jederzeit bereit war, anstehende Probleme mit mir zu diskutieren.

Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Merker danke ich für die Anfertigung, Interpretation und Überlassung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Der Arbeitsgruppe K. Keller, H. Kolbe, K. Lange, I. Monden und H. Brauns herzlichen Dank für die vielen Anleitungen und Ratschläge, die vor allem die experimentelle Arbeit erleichterten.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 10. Februar 1945 als Sohn des Obermedizinalrats Dr. Herbert Meyer-Estorf und seiner Ehefrau Ilse, geborene Gombert, in Salzwedel in der Altmark geboren. 1951 siedelte meine Familie nach West-Berlin über, wo ich bis 1957 die Grundschule besuchte. Ostern 1957 trat ich in die Albrecht-Dürer-Oberschule in Berlin-Neukölln über. Nach dem Umzug meiner Familie nach Regensburg in Bayern 1959 besuchte ich das dortige Goethe-Gymnasium, wo ich im Sommer 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Am 1. 10. 1966 wurde ich als Wehrpflichtiger in den Sanitätsdienst der Luftwaffe der Bundeswehr einberufen und am 30. 9. 1967 als Fahnenjunker d. R. entlassen.

Im Wintersemester 1967 nahm ich an der damaligen Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin das Studium der Medizin auf. 1968 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, 1970 die ärztliche Vorprüfung und am 22. 2. 1974 das medizinische Staatsexamen.

Vom 1. 4. 1974 bis 31. 7. 1974 war ich als Medizinalassistent am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin tätig. Seit dem 1. 9. 1974 arbeite ich als Medizinalassistent im Städtischen Krankenhaus Landshut.

B. Ladewig-Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198